

## タバコ培養細胞 BY-2 のエリシター誘導性プログラム細胞死における 新規植物細胞死制御候補因子 NtILP1 の作用についての研究

<sup>1</sup> 平野 祐毅 <sup>1</sup> 東 克己

<sup>1</sup> 帝京科学大学大学院理工学研究科バイオサイエンス専攻

The studies of the effect of a novel candidate of plant cell death regulator, NtILP1,  
on elicitor-induced programmed cell death in Tobacco BY-2 cells.

<sup>1</sup> Yuuki HIRANO <sup>1</sup> Katsumi HIGASHI

<sup>1</sup> Division of Biosciences, Graduate School of Science & Engineering, Teikyo University of Science, Graduate School

### Abstract:

IAP like proteins (ILPs) are newly found paralogs of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) from wide variety of eukaryotes including fission yeast, mammals and higher plants. Because a human ILP (HsILP1) function as a cell death inhibitor in several human cells like IAPs, there is a possibility that plant ILPs also have the same function. To assess the possibility, we tested plant ILP function using an established cell death assay systems with tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultured cells, BY-2. We isolated two ILP homolog genes, referred to as *Nicotiana tabacum* IAP like protein 1 (*NtILP1*) and *NtILP2*, from tobacco BY-2 cells, then produced transformed BY-2 cell lines which are overexpressed or suppressed *NtILP1*. A BY-2 cell line overexpressed *NtILP1* (*NtILP1OX1*) showed the decrease in cell death induced by a proteinaceous fungal elicitor, cryptogein, whereas acceleration of cell death was observed in another BY-2 cell line which is suppressed *NtILP1* expression (*NtILP1RNAi3*). The expression of *NtILP1* in elicitor-applied tobacco BY-2 cells strongly suggested *NtILP1* acts as a cell death inhibitor.

Key Words : NtILP1, programmed cell death, tobacco BY-2, elicitor,

### 1. 序論

プログラム細胞死 (programmed cell death, PCD) は、多細胞生物において普遍的に認められる遺伝的に制御された細胞の自殺である。種子植物においても、PCD は発生・分化過程や、環境ストレス応答、防御応答など様々な場面で重要な役割を担っている<sup>1)</sup>。なかでも過敏感反応と呼ばれる PCD は、植物病原体の感染に対する防御応答の一種であり、原因となるエリシター (植物に過敏感反応を引き起こす物質の総称) や病原体の添加により人為的かつ比較的容易に細胞死を再現することが可能で、作物の感染防御の観点から応用面での重要性も高いため、これまでに多くの科学的知見が蓄積している<sup>2)</sup>。過敏感反応においては、初期反応により生じた細胞内シグナルが、その後ミトコンドリアの活性低下、細胞周期の停止などを引き起こし、最終的に液胞が崩壊し、細胞死へと至る反応の引き金を引くと考えられている。この過程のうち、細胞膜近傍での変化については、これまでに多くの研究が行われ、多数の知見が蓄積しているものの、細胞内における細胞死実行過程までのシグナル伝達過程につ

いては、まだ未解明な部分が多い<sup>3-9)</sup>。

動物細胞におけるアポトーシスは、最も研究されている PCD の一形態であり、細胞内のアポトーシス開始から実行までのシグナル伝達経路についての豊富な知見がある<sup>10-12)</sup>。このアポトーシスのシグナル伝達に関する主要な因子については、blast (basic local alignment search tool) 法による相同性検索では植物からはほとんど見出されていないにも関わらず<sup>13)</sup>、いくつかのアポトーシス関連因子により植物の PCD が抑制されることが報告されている<sup>14, 15)</sup>。これらの知見に基づいて、我々はこれまでに、動物のアポトーシス抑制因子である inhibitor of apoptosis protein (IAP) の baculovirus IAP repeat (BIR) ドメインによく似た BIR like Domain (BLD) を持ち、IAP に弱い相同性を示す IAP like protein (ILP) をシロイヌナズナより 2 つ見だし、*AtILP1* および *AtILP2* と命名した<sup>16)</sup>。BLD を query とした blast (核酸データベースを検索する translated blast 法) による解析結果から、*ILP* 遺伝子は植物だけでなく、分裂酵母や線虫およびヒトを含む脊椎動物にも存在する、*IAP* 遺伝子

の paralog (遺伝子重複により生じた相同遺伝子) であることが推測された<sup>16)</sup>。

こうして見出した ILP のうち、ヒトの HsILP1 をヒト HelaS3 細胞および HEK293 細胞で過剰発現させたところ、トポイソメラーゼ阻害剤である etoposide によって誘導されるアポトーシスを抑制することが示された<sup>16)</sup>。また、他の研究グループにより血球細胞におけるアポトーシスを抑制することも示されている<sup>17)</sup>。このことから、HsILP1 は動物における新規細胞死制御因子であることが示唆された。一方植物においてはこれまで細胞死に影響を与える明らかな結果が得られていない<sup>18)</sup>。この原因として、これまで優れた PCD 誘導実験系が存在していないシロイヌナズナを実験材料として用いてきており、はっきりとした結果が出にくく、ILP が細胞死に対してどのような作用を持つのか明らかにしにくかったことが挙げられる。

そこで、本研究においては優れた PCD 誘導実験系が開発されている植物であるタバコ (*Nicotiana tabacum* L.) 培養細胞である BY-2 細胞を用いて、ILP の機能解明を行うこと目的に実験を行った。まず、タバコゲノムに存在する *ILP* ortholog (種分化により分かれた相同遺伝子) を単離することを試みた結果、*AtILP1* の ortholog である *NtILP1* の ORF (open reading frame; 遺伝子 DNA 上の開始コドンから終止コドンまでの領域) の cDNA の単離に成功した。また *AtILP2* と相同性を持つ *NtILP2* の mRNA の塩基配列の一部も単離した。単離した *NtILP1* ORF の配列を基に *NtILP1* 過剰発現用、*NtILP1* 発現抑制用のコンストラクトを作製し、タバコ BY-2 細胞に導入して遺伝子導入細胞株を作出した後、植物病原性をもつ卵菌類の *Phytophthora cryptogea* 由来のタンパク質性エリシター cryptogein によって誘導される過敏細胞死において *NtILP1* の過剰発現または発現抑制がどのような作用を示すかを解析した。

## 2. 実験材料と方法

### タバコ培養細胞 BY-2 の培養

タバコ培養細胞 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2、以後“BY-2 細胞”と表記) は<sup>19)</sup>、300 ml 三角フラスコに分注した 100 ml BY 培地に 7 日間培養後の懸濁培養液 1.0 ml を植え継ぎ、28℃、暗所、130 rpm で継代培養した。cDNA の単離や定常時の遺伝子発現の解析には継代 7 日後の植え継ぎ前の細胞を回収して利用し、細胞死アッセイには、継代 7 日後のタバコ BY-2 細胞を新鮮な液体 BY 培

地に 30 分の 1 量加えてけん濁し、3 日間 28℃、暗所、130 rpm で前培養したのちに実験に用いた。

### cryptogein の調製と使用

*cryptogein* 遺伝子を形質転換したメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* (Cry GT) を用いて *cryptogein* の合成を行った<sup>20)</sup>。形質転換酵母の培養は *Pichia* expression kit (Life technologies) のプロトコールに従った。*cryptogein* を含む培養上清を透析チューブ (UC36-32-100, 三光純薬) は超純水中で 16 時間以上透析後 (最初 1 時間毎に 2 回超純水を交換) 凍結乾燥機 (PRD-50P, IWAKI) を用いて凍結乾燥した。その後、1.5 ml チューブに適量ずつ小分けにして -80℃ ディープフリーザーで保存し、実験ごとに必要量を取り出して超純水に再懸濁後、277 nm の吸光度を測定して原法に従ってタンパク質濃度に換算し<sup>20)</sup>、実験に供した。

### cryptogein 添加による BY-2 細胞の細胞死アッセイ

*cryptogein* 添加によって起こる細胞死は PCD であり<sup>7) 8) 21)</sup>、PCD による細胞死を観察するための手法として、Evans blue 染色法が用いられている。継代 7 日目の BY-2 細胞を含む培養液を、BY 培地 30 ml あたり 1 ml 移し、28℃、暗所、130 rpm で 3 日間培養した。培養液を 12 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 900  $\mu$ l ずつ分注し、終濃度 0、0.25  $\mu$  M、0.5  $\mu$  M、1.0  $\mu$  M となるように *cryptogein* 溶液をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ添加した。振とう培養機で 28℃、130 rpm の条件で 24 時間加温後、溶液を 700  $\mu$ l 取って 1.5 ml チューブに回収し、上清を除いた後 0.05% Evans blue 溶液を 0.75 ml 添加して 10 分間室温で穏やかに振盪した。その後、超純水を用いて色素が溶出されなくなるまで洗浄した後、染色された死細胞を顕微鏡下で観察した。観察像はデジタルカメラで撮影し、PC に取り込んだ画像上で、全細胞数および死細胞をカウントして細胞死率を求めた。

### *NtILP1* 及び *NtILP2* cDNA の単離と解析

*NtILP1* cDNA の単離は、RACE 法を用いて行なった。*AtILP1* の cDNA 配列を query として、tblastn によりタバコの cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism) 断片の配列中より、相同性のある断片 (AJ718124) を見出した。この断片の塩基配列をもとに 3'RACE 用のプライマーを作成した (図 1)。

タバコ BY-2 細胞 total RNA サンプルから

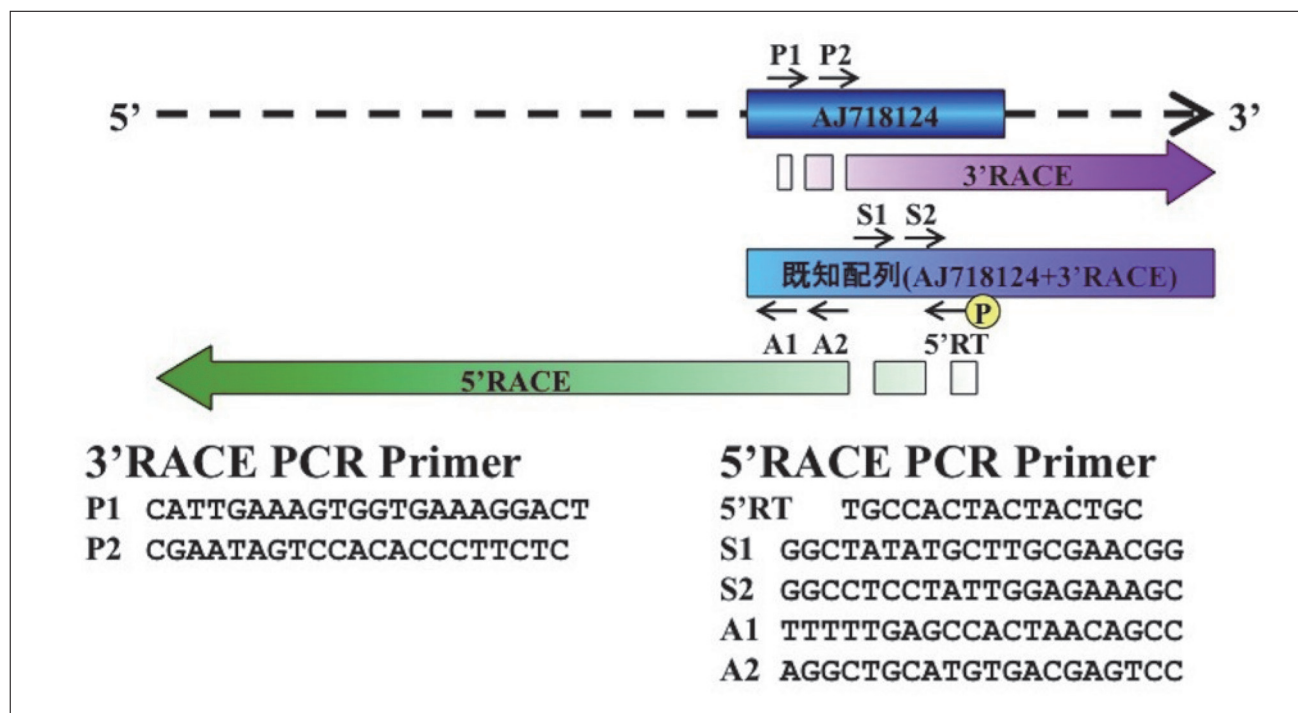


図1 NtILP1 クローニングのスキーム

既知配列であるAJ718124の情報をもとに特異的プライマーP1, P2を作成し、3' RACE法によりAJ718124の下流の配列を決定した。その後、3' RACE法の結果を加えた配列情報(AJ718124+3' RACE)をもとに5'末端にリン酸基を付加した5' RTプライマーを用いて5'側をふくむcDNAを合成し、S1-A2のプライマーセットでPCRを行い、その増幅産物を鋳型としてさらにS2-A1プライマーでPCRを行なって、5'側をクローニングした。

のcDNAの合成にはInvitrogenのSuperscript double-strand cDNA synthesis kitを用い、定法に従ってcDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型とした3'-RACE法によりcDNA断片を回収し、Big Dye terminator v3.1 (Life Technologies)を用いたcycle sequencingとABI Prism 3100 (Life Technologies)による塩基配列解析により求めた。得られた塩基配列をもとに、5'-RACE用プライマーを作成し、5'-full RACE core kit (タカラバイオ)によりORF全長を含むcDNA配列を同定した。得られた配列をもとにPCRによりNtILP1 ORFのcDNAを得た(図2)。得られたORFについては、塩基配列解析を行ない、増幅エラーが含まれていないことを確認した。

NtILP2については、Computational Biology and Functional Genomics Laboratoryにおけるthe Gene Index ProjectのDFCI Tobacco Gene Index (<http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tobacco>)において、AtILP2のBLD領域をqueryとして相同性検索を行なった結果、BY-2細胞由来の候補配列の中からAtILP2と高い相同性(アミノ酸レベルで40%、BLD領域では71.4%)を示す断片が見出された。そこでこの配列を含有する遺伝子

をNtILP2と名付けた。NtILP2のBLD1をコードする領域の5'末端側から749番塩基までをターゲットとするようにプライマーを作成し(NtILP1\_2RACEGSP1 primer; TGCTAGAAGAGGTTGGATTAATGTA、NtILP2\_749R; GTCGAGGAACCATGGAAAAA)、半定量RT-PCRを行った。

#### 遺伝子導入のためのコンストラクトの作成

NtILP1過剰発現株の作成のために、NtILP1のORFにcauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoterとnopaline synthase (NOS) terminatorを接続したキメラ遺伝子NtILP1OXを作成した(図2)。また、RNA干渉(RNAi)による発現抑制株作出のために、NtILP1のBIR like domain (BLD) 1をコードする領域を含む600 bpの断片を、AtILP2 intron6を介して逆向きに接続したキメラ遺伝子NtILP1RNAiを作成した(図2)。これらの遺伝子をアグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens LBA4404)を用いたバイナリーベクター法によりタバコBY-2細胞に導入した。形質転換細胞株は、同時にカナマイシン耐性遺伝子(neomycin phosphotransferase II, NPTII)を導入し、カナマイシン耐性細胞株として選抜した。



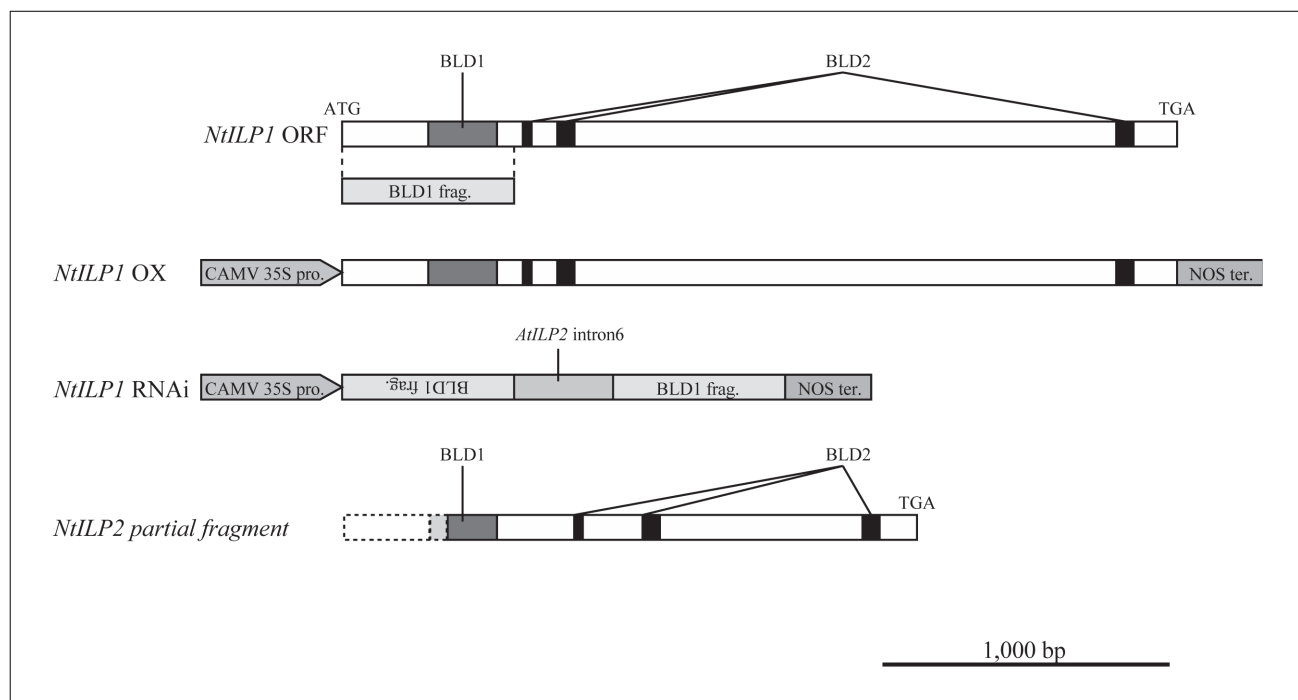


図2 *NtILP1* 及び *NtILP2* の構造と導入したコンストラクト

*NtILP1* および *NtILP2* 遺伝子の構造と、実際に遺伝子導入した *NtILP1* キメラ遺伝子の構造を模式的に表した。それぞれの遺伝子について BLD1 および BLD2 をコードする領域を示してある。また、*NtILP2* については、5' の一部が未クローニングであるため、予測される cDNA 領域を点線で示した。CaMV35S pro; cauliflower mosaic virus 35S 遺伝子プロモーター、NOS ter; nopaline synthase 遺伝子ターミネーター、*AtILP2* intron6; *AtILP2* 遺伝子の 6 番目のイントロン。

## 半定量的 RT-PCR

### (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

定常時の遺伝子発現解析については、継代後 7 日目の BY-2 細胞を 3.5 ml 程度ずつサンプリングし、メッシュサイズ 75  $\mu$ m のナイロンメッシュ上に回収した。水分を切ってから細胞の生重量を測定し、0.2 g 生重量以下になるように量りとして 1.5 ml チューブに入れ、液体窒素で凍結し -80℃ で保存した。回収した BY-2 細胞を液体窒素で凍らせた後、冷やした乳鉢中で TRIzol (life Technologies) を 1 ml 加えた上でよくすりつぶし、1.5 ml チューブに移した。その後メーカーのプロトコールに従って total RNA を抽出した。抽出した total RNA は RNase free H<sub>2</sub>O を 50  $\mu$ l 加えて 60℃、10 分間加熱して溶解後、吸光度を測定した。測定後の total RNA 試料は実験に用いるまでエタノール沈殿した状態で -80℃ にて保存した。

RT-PCR の逆転写反応については TaKaRa PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit (タカラバイオ) ,PCR については Go Taq Flexi<sup>®</sup> DNA Polymerase (プロメガ) を使い、メーカーのプロトコールにしたがい、サーマルサイクラー (PCR9700, Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として

さらに PCR を行ない、増幅した cDNA 断片はアガロースゲル電気泳動後 SYBR<sup>®</sup> Green I (タカラバイオ) により染色し、Dark Reader<sup>®</sup> (Cleare Chemical Research) 上デジタルカメラを用いて撮影した。増幅した DNA 断片は、IrfanView (<http://irfanview.com>) 及び ImageJ (<http://www.nih.gov>) を用いて蛍光強度を測定した。*EF1* (*elongation factor 1*)  $\alpha$  を内部標準として *NtILP1* または *NtILP2* の蛍光強度を平準化し、相対蛍光強度を求めた。

## 3. 結果

### *NtILP1* 及び *NtILP2* の cDNA の単離と解析

3' RACE および 5' RACE 法により単離された *NtILP1* cDNA について、シーケンス解析を行なった。その結果、コードするタンパク質はシロイヌナズナの *AtILP1* と予測されるアミノ酸配列でアミノ酸残基が完全に一致するのが 55.7%、性質の似たアミノ酸残基について 86.0% の相同性が見られた。また、BLD1 および BLD2 が保存されていた (アミノ酸配列における相同性でそれぞれ 52.5%、77.3%)。一方部分断片が得られた *NtILP2* については、全長のアミノ酸レベルの相同性で 40.0%、BLD1 領域については 71.4% であった。

### 過剰発現株、発現抑制株における *NtILP1* 発現変化の解析

遺伝子組換えにより *NtILP1OX* 遺伝子及び *NtILP1RNAi* 遺伝子を BY-2 細胞に導入し、同時に導入したカナマイシン耐性遺伝子 (*NPT II*) により抗生物質耐性を示した複数の細胞系統をそれぞれ得た。得られた細胞株中で、*NtILP1OX* については 2 系統 (OX1, OX2)、*NtILP1RNAi* については 3 系統 (RNAi1 ~ 3) を選び、*NtILP1* 発現量が変化しているかどうかについて調べた。

非形質転換体 (NT) 株および形質転換 BY-2 細胞株における *NtILP1* の mRNA 蓄積量を半定量的 PCR により解析した。PCR は BLD 領域を含む 292 bp ~ 920 bp をターゲットとした。継代培養している細胞株を異なる継代回に 3 度回収して RT-PCR を行なった結果、有意差は見られなかったものの、*NtILP1OX1* 株においては NT 株と比較して常に 1.5 倍 ~ 2.5 倍に蓄積量が上昇していた (図 3)。一方、

*NtILP1OX2* 株においては、蓄積量が NT 株よりも常に低かった (図 3)。

*NtILP1RNAi* 導入株においては、RNAi3 株のみ *NtILP1* mRNA 蓄積量が有意に NT 株より低かった。(図 3)。

### *NtILP1* 過剰発現株、発現抑制株の細胞死の解析

*NtILP1* 過剰発現株及び発現抑制株を用い、cryptogein 誘導性 PCD に対する *NtILP1* 発現変化の影響について解析した。異なる濃度の cryptogein を添加して 24 時間後の細胞死について観察した (図 4)。実験は 3 回繰り返し、それぞれについて細胞死率をグラフ化した (図 5)。

過剰発現株のうち OX1 株は 3 回の実験全てで NT 株に比べ細胞死率が低く抑えられていた (図 5)。また、RNAi3 株については常に NT 株よりも高い細胞死率を示し、0.5  $\mu$ M の cryptogein 添加で全ての細胞が細胞死を引き起こした (図 4、5)。

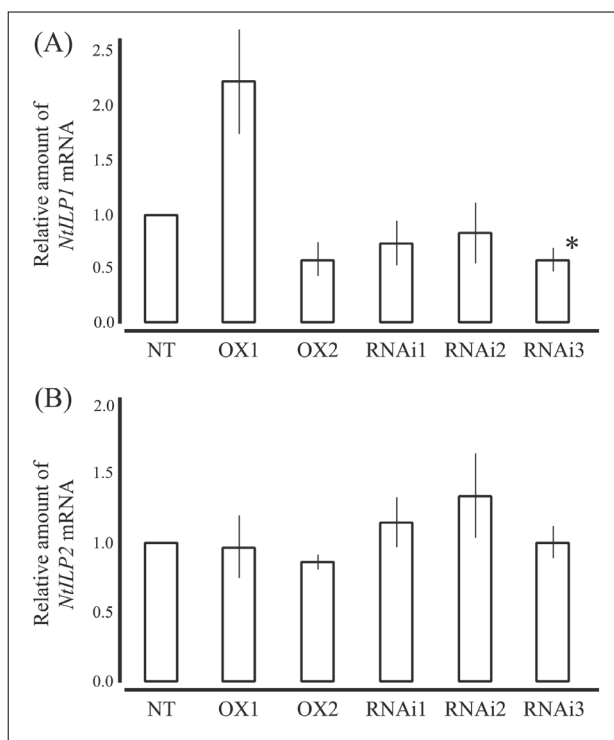


図 3 *NtILP1* 過剰発現株及び発現抑制株における *NtILP1* 及び *NtILP2* mRNA の蓄積量

各遺伝子導入株の定常時における *NtILP1* mRNA (A) 及び *NtILP2* mRNA (B) の蓄積量を半定量的 RT-PCR により測定した。*NtILP1*、*NtILP2* mRNA 蓄積量を *EF1  $\alpha$*  mRNA の蓄積量で平準化後、非形質転換体 (NT) 株の数値を 1 とした時の相対値で示した。標準誤差 (n=3) を bar で示し、t 検定を行なって  $p < 0.05$  で有意な差が認められたものにアスタリスクを付した。NT; 非形質転換株、OX1; *NtILP1OX1* 株、OX2; *NtILP1OX2* 株、RNAi1; *NtILP1RNAi1* 株、RNAi2; *NtILP1RNAi2* 株、RNAi3; *NtILP1RNAi3* 株。

### 過剰発現株、発現抑制株における *NtILP2* の発現変化の解析

我々はシロイヌナズナにおいて、*AtILP1* と *AtILP2* の 2 つの ILP 遺伝子を見出している<sup>16)</sup>。タバコにおいてもこの 2 つの遺伝子が存在すると考えられたので、*NtILP2* mRNA の蓄積量の変動を解析した (図 3)。そこでこの配列を含有する遺伝子を *NtILP2* と名付け、*NtILP2* の BLD1 をコードする領域の 5' 末端側から 749 番塩基までをターゲットとし、半定量 RT-PCR を行った。その結果、わずかな差はあるものの、ほぼ全てのラインにおいて非形質転換体と同等量の転写産物の蓄積が認められた

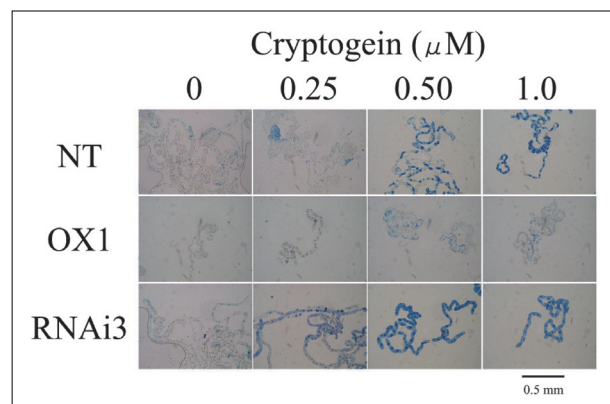


図 4 Evans blue 染色による細胞死の観察

*NtILP1* 過剰発現株及び発現抑制株における cryptogein 添加後 24 時間後の Evans Blue 染色の結果により観察した。青く染色された細胞が死細胞。NT; 非形質転換株、OX1; *NtILP1OX1* 株、RNAi3; *NtILP1RNAi3* 株。

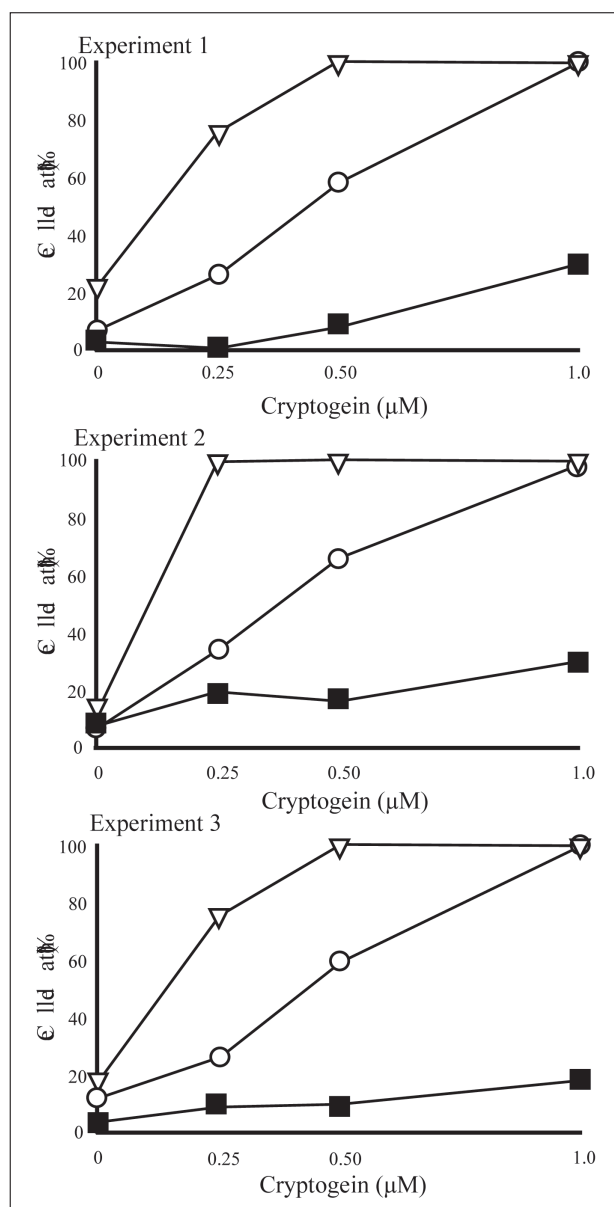


図5 *NtILP1* 過剰発現株及び発現抑制株における cryptogein 添加濃度と細胞死率の関係

Cryptogein 添加 24 時間後に Evans blue 染色により細胞死率を求めた。(○) 非形質転換株、(■) *NtILP1OX1* 株、(▽) *NtILP1 RNAi3* 株。

(図3(B))。この結果から、*NtILP1* の発現変動は細胞死誘導前の *NtILP2* mRNA の蓄積量に対してほとんど影響しないことが示された。

#### *NtILP1* 発現量の違いと細胞死亡率

定常状態の *NtILP1* および *NtILP2* の mRNA 蓄積量の測定から、常に *NtILP1* mRNA 発現量が高い OX1 株では細胞死亡率が低く、発現量が低下している RNAi3 株においては細胞死亡率が高いことから、*NtILP1* が細胞死を抑制する働きをもつことが示唆された。

## 4. 考察

シロイヌナズナから単離された *ILPs* は、動物の *IAP* と paralogous な関係にあると考えられ、ヒトの *HsILP1* についてはアポトーシスを抑制する作用が観察されている<sup>16, 17)</sup>。一方植物においては、これまでにシロイヌナズナを用いて *AtILP1* 及び *AtILP2* の細胞死との関連を調べてきたが、明白な関係性は見出せていない<sup>18)</sup>。本研究では、植物における PCD の優れた実験系があるタバコ培養細胞 BY-2 を用いることで、植物における *ILPs* の機能解析を試みた。*NtILP1* のクローニング後、過剰発現用コンストラクト (*NtILP1OX*) および発現抑制用コンストラクト (*NtILP1RNAi*) を作成し、アグロバクテリウム法により BY-2 細胞に導入した後、cryptogein 誘導性 PCD における *NtILP1* 発現変化の影響を調べることにした。

作出した BY-2 細胞株のうち、OX1 株では有意差はないものの *NtILP1* mRNA の発現量に上昇傾向が認められた (図3)。このことから、本研究においてはこれを過剰発現株として使用した。一方 OX2 株については、はっきりとした発現量の増加が見られないことから、遺伝子導入したもとの細胞に何らかの問題が生じている可能性があるため、本来の目的に合う細胞株ではないと判断した。一方 RNAi 株については、RNAi3 株のみが有意に発現量が減少していた (図3)。これらの結果より、本実験の目的通りに導入遺伝子が機能する細胞株として、OX1 株と RNAi3 株が得られた。この2系統を用いて、cryptogein 誘導性細胞死への影響を調べた。

その結果、OX1 株においては細胞死の抑制が起こり、RNAi3 株では細胞死促進効果が認められた。このことは、*NtILP1* がより強く発現することで細胞死が抑制され、逆に発現量が低下すると細胞が死にやすくなることを示している。この結果より、ヒトの *HsILP1* 同様、*NtILP1* には細胞死抑制作用があることが示された。

これまでにシロイヌナズナやイネより、*ILP1* の paralog として *ILP2* が存在することが示されている<sup>16)</sup>。タバコからも同様に paralog である *NtILP2* が見いだされたが、これらの遺伝子の発現や機能に関連性がある場合、*NtILP1* の人為的な発現変動に伴って *NtILP2* の発現に影響があることが考えられる。そこで、定常状態における *NtILP2* の発現を調べたところ、NT 株に対する明瞭な変化は見られなかった (図3)。

今回得られた結果より、*NtILP1* タンパク質が植物の過敏感反応における細胞死を抑制していることが



示された。今後、過敏反応実行時に、どのようなメカニズムにより *NtILP1* の発現が抑制されるのかについて、プロモーター解析などの手法により調査をする必要がある。また、NtILP1 タンパク質がどのような作用機序で細胞死を抑制するのかについても解析を行う必要がある。最近になって、ヒト IAP の一部でみられる C 末端側のリングフィンガードメインを有するタンパク質が植物からも見いだされ、細胞死抑制を行なっていることが報告された<sup>22)</sup>。このことは、これまでの予想に反して、IAP の細胞死抑制作用が保存されている BIR 領域にはない可能性を示している。一方で、HsILP1 (NIPA) に加えて本研究により NtILP1 にも細胞死抑制を行なう作用があることが示されたことから、ILP は IAP とは異なる細胞死抑制機構を有している可能性がある。例えば、タバコにおいては、PCD が実行される前に、細胞周期が停止することが知られており、cryptogein による細胞死は、細胞周期の進行が密接に関わっていることが知られている<sup>21)</sup>。また、*NtILP1* と相同性を示す *HsILP1* (NIPA) は SCF (Skip1-cullin-F-box) 複合体 (ユビキチンをタンパク質に結合するユビキチンリガーゼの一種) サブユニットの一つである F box 因子 (SCF 複合体中で標的タンパク質の認識に関わるサブユニット) であり、サイクリン B1 を調節することで細胞周期を調節している<sup>23)</sup>。これらの結果を考慮すると、ILP が細胞周期の調節を通じて PCD に影響を与えている可能性がある。そこで ILP の細胞周期と細胞死に関する役割について、今後詳しく解析をしていく必要があるだろう。また、*NtILP2* についても、全長配列を単離した後、本研究における *NtILP1* 同様に細胞死に対する作用についての解析を行い、2 つの ILP と細胞死との関連性について調べる必要がある。

## 5. 参考文献

1. R. Mitter, E Lam: Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends Microbiol.*, 4: 10-15, 1997.
2. A. M. Jones: Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol.*, 125:94-97, 2001.
3. K. Kuchitsu, M. Kikuyama, N. Shibuya: N-Acetylchitoooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 174: 79-81, 1993.
4. A. Pugin, J. Frachisse, E. Tavernier, R. Bligny, E. Gout, R. Douce, J. Guern: Early events induced by the elicitor Cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant cell*, 9: 2077-2091, 1997.
5. J. Ebel, A.A. Bhagwat, E.G. Cosio, M. Feger, U. Kissel, A. Mithöfer, T. Waldmüller: Elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of a phytoalexin defense response. *Can. J. Bot.*, 73: 506-510, 1995.
6. E. Tavernier, D. Wendehenne, J.P. Blein and A. Pugin: Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.*, 109: 1025-1031, 1995.
7. M. Binet, C. Humbert, D. Lecourieux, M. Vantard, A. Pugin: Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol.*, 125: 564-572, 2001.
8. Y. Kadota, T. Goh, H. Tomatsu, R. Tamauchi, K. Higashi, S. Muto, K. Kuchitsu: Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant Cell Physiol.*, 45: 160-170, 2004.
9. 川崎努、島本功: G タンパク質を介した抵抗性のシグナル伝達. 島本功、渡辺雄一郎、柘植尚志 (監修), 植物細胞工学シリーズ 19 「分子レベルからみた植物の耐病性」, 秀潤社, 東京, 2004, pp 111-117.
10. J. C. Reed: Mechanisms of apoptosis. *Amer. J. Pathol.*, 157: 1415-1430, 2000.
11. Y. Shi: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell*, 9: 459-470, 2002.
12. Q. Deveraux, J. Reed: IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Gene. Dev.*, 13: 239-252, 1999.
13. E. Lam, N. Kato, M. Lawton: Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411: 848-853, 2001.

14. M. Dickman, Y. Park, T. Oltersdorf, W. Li, T. Clemente, R. French: Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *PNAS*, 98: 6957–6962, 2001.
15. I. Mitsuhara, K. Malik, M. Miura, Y. Ohashi: Animal cell-death suppressors Bcl-x (L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. boil.*, 9: 775–778, 1999.
16. K. Higashi, R. Takasawa, A. Yoshimori, T. Goh, S. Tanuma, K. Kuchitsu: Identification of a novel gene family, paralogs of inhibitor of apoptosis proteins present in plants, fungi, and animals. *Apoptosis*, 10: 471–480, 2005.
17. T. Ouyang, R-Y. Bai, F. Bassermann, C. von Klitzing, S. Klumpen, C. Miething, S. Morris, C. Peschel, J. Duyster: Identification and characterization of a nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA) . *J. Biol. Chem.*, 278: 30028–30036, 2003.
18. 小林和：シロイヌナズナの新奇プログラム細胞死制御候補因子 AtILP1, AtILP2 の機能解析 . 平成 19 年度東京理科大学大学院理工学研究科応用生物科学専攻修士論文 , 2007.
19. T. Nagata, Y. Nemoto and S. Hasezawa: Tobacco BY-2 cell line as the ‘Hela’ cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, 132: 1–30, 1992.
20. M. O'Donohue, G. Boissy, J. Huet, C. Nespoulous, S. Brunie, J. Pernollet: Overexpression in *Pichia pastoris* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus, *Phytophthora cryptogea*. *Protein Expr. Purif.*, 8: 254–261, 1996.
21. Y. Kadota, T. Watanabe, S. Fujii, K. Higashi, T. Sano, T. Nagata, S. Hasezawa, K. Kuchitsu: Crosstalk between elicitor-induced cell death and cell cycle regulation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.*, 40: 131–142, 2004.
22. W.Y. Kim, S.Y. Lee, Y.J. Jung, H.B. Chae, G.M. Nawkar, M.R. Shin, S.Y. Kim, J.H. Park, C.H. Kang, Y.H. Chi, I.P. Ahn, D.J. Yun, K.O. Lee, Y.-M. Kim, M.G. Kim, S.Y. Lee: Inhibitor of apoptosis (IAP) -like protein lacks a baculovirus IAP repeat (BIR) domain and attenuates cell death in plant and animal systems. *J. Biol. Chem.*, 286: 42670–42678, 2011.
23. F. Bassermann, C. von Klitzing, S. Münch, R-Y. Bai, H. Kawaguchi, S. Morris, C. Peschel, J. Duyster: NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell*, 122: 45–57, 2005.